 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.05.13 J South Med Univ, 2015, 35(5): 692-696

基础研究

Notch1胞内结构域慢病毒表达载体及干扰载体的构建

周学亮，刘季春
南昌大学第一附属医院心血管外科，江西 南昌 330006

摘要：目的 构建高滴度大鼠N1ICD慢病毒过表达载体(LV-N1ICD)及N1ICD慢病毒干扰载体(LV-N1ICD-shRNA)。**方法** 以大鼠cDNA文库为模板，PCR法扩增N1ICD，通过定向克隆构建pGC-FU-N1ICD-3Flag穿梭质粒；设计4对N1ICD-shRNA寡核苷酸序列，以构建GVC112-N1ICD-shRNA干扰质粒，将pGC-FU-N1ICD-3Flag和GVC112-N1ICD-shRNA共转293T细胞，检测Flag的表达，筛选理想的GVC112-N1ICD-shRNA干扰质粒。将pGC-FU-N1ICD-3Flag或GVC112-N1ICD-shRNA与pHelper 1.0、pHelper 2.0共转293T细胞，以包装LV-N1ICD和LV-N1ICD-shRNA，分别利用Real-time PCR、药物筛选法进行病毒滴度测定。LV-N1ICD及LV-N1ICD-shRNA分别感染H9c2心肌细胞，利用CCK-8检测细胞活力。**结果** pGC-FU-N1ICD-3Flag和GVC112-N1ICD-shRNA质粒经PCR、基因测序及Western-blotting验证构建成功，与pHelper 1.0、pHelper 2.0共转293T细胞后，取上清浓缩，分别获得高滴度LV-N1ICD和LV-N1ICD-shRNA。LV-N1ICD可明显提高心肌细胞活力，LV-N1ICD-shRNA可降低心肌细胞活力。**结论** LV-N1ICD和LV-N1ICD-shRNA包装成功，具有Notch1信号通路生物学功能。
关键词：Notch信号通路；胞内结构域；慢病毒；质粒构建；RNA干扰；病毒包装

Construction of the N1ICD lentiviral over-expression and interference vectors

ZHOU Xueliang, LIU Jichun
Department of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To construct rat N1ICD lentiviral over-expression vector (LV-N1ICD) and N1ICD lentivirus interference vector (LV-N1ICD-shRNA. **Methods** With the rat cDNA as a template, the N1ICD fragment was amplified by PCR to construct pGC-FU-N1ICD-3Flag shuttle plasmid by directly clone. Four pairs of N1ICD-shRNA oligonucleotide sequences were synthesized to construct the GVC112-N1ICD-shRNA interference plasmid. pGC-FU-N1ICD-3Flag and GVC112 -N1ICD-shRNA plasmids were co-transfected into 293T cells to screen for the best interference plasmid in the 4 GVC112-N1ICD-shRNA plasmids by detecting Flag expression. pGC-FU-N1ICD-3Flag or GVC112-N1ICD-shRNA plasmid along with with pHelper 1.0 and pHelper 2.0 plasmids were co-transfect into 293T cells to package LV-N1ICD and LV-N1ICD-shRNA, and the virus titer was determined by real-time PCR and drug screening method, respectively. H9c2 cells infected with LV-N1ICD and LV-N1ICD-shRNA respectively were assessed for cell viability using CCK-8 assay. **Results** pGC-FU-N1ICD-3Flag and GVC112-N1ICD-shRNA plasmid were verified by PCR, gene sequencing and Western blotting. Co-transfection of the plasmids with pHelper 1.0, and pHelper 2.0 plasmids into 293T cells obtained high-titer LV-N1ICD and LV-N1ICD-shRNA. LV-N1ICD was capable of promoting the cell viability and LV-N1ICD-shRNA produced an opposite effect. **Conclusion** The vectors LV-N1ICD and LV-N1ICD-shRNA have been successfully constructed and packaged, which have the biological functions of Notch1 signaling.
Keywords: notch signaling; intracellular domain; lentivirus; plasmid construction; RNA interference; virus packaging

Notch信号通路为邻近细胞之间信息交流平台，激活后经二次裂解，释放Notch胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)进入细胞核，启动靶基因转录，发挥生物学效应[1]。研究发现Notch不仅调节胚胎期心脏的发育和分化[2]，而且刺激未成熟心肌细胞的增殖[3]，促进静止期心肌细胞重新进入细胞周期，有利于损伤心肌的再生修复[4]。最新研究发现Notch1信号通路的激活可加快心肌梗死后期心功能的恢复[5]。因此本研究将包装高滴度Notch1胞内结构域(Notch1 intracellular domain, N1ICD)慢病毒过表达载体(N1ICD lentiviral vector, LV-N1ICD)及N1ICD慢病毒干扰载体(N1ICD-shRNA lentiviral vector, LV-N1ICD-shRNA)，并研究其在H9c2心肌细胞中的生物学功能，为探讨Notch1信号通路在心肌保护作用奠定研究基础。

收稿日期：2014-10-22
基金项目：国家自然科学基金(81260024)；江西省自然科学基金(20122BAB205026, 20132BAB205033)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81260024).
作者简介：周学亮，博士，主治医师，E-mail: Dr_zhouxliang@163.com
通信作者：刘季春，博士，教授，主任医师，E-mail: Liujichun999@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及菌株 293T细胞、H9c2心肌样细胞购于中科院上海生命科学院细胞库，DH5α化学感受态细胞购

于Invitrogen。

1.1.2 大鼠cDNA文库及慢病毒载体系统 大鼠cDNA文库来购于TAKARA；pGC-FU-EGFP-3Flag Vector、GV112 Vector、pHelper 1.0 plasmid、pHelper 2.0 plasmid购于上海吉凯基因化学技术有限公司。

1.1.3 主要试剂 Taq DNA polymerase购于北京全式金生物技术有限公司，限制性核酸内切酶(*Age* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ)购于New England Biolabs；T_4 DNA Ligase购于TaKaRa，凝胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒购于OMEGA，In-Fusion PCR Cloning Kit购于Clontech laboratories；Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen，细胞裂解液购于碧云天生物技术研究所，小鼠抗Flag单克隆抗体购于anbo，小鼠抗β-Actin单克隆抗体购于Cell signaling technology；辣根过氧化物酶标记山羊小鼠IgG均购于北京中杉金桥公司，化学发光试剂盒(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate)购自美国Pierce，CCK-8试剂盒购于Solarbio。

1.1.4 引物设计与合成 根据GeneBank中的大鼠Notch1基因编码序列(NCBI Reference Sequence: NM_001105721)，Primer Premier 5.0设计N1ICD克隆引物并插入*Age* Ⅰ与*Nhe* Ⅰ酶切位点(Forward Primer: 5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGG TGCTGCTGTCCCGCAAGC-3', Reverse Primer:5'-T CATCCTTGTAGTCGCTAGCCTTAAATGCCTCTG-GAATG-3')，产物大小为2364 bp；设计N1ICD鉴定引物(Forward Primer: 5'-GTGCAGACCCAGCAGGT G-3', Reverse Primer: 5'-AGCGTA AAAGGAGCAAC ATAG-3')，产物大小为665 bp；设计LV-N1ICD Real-time PCR引物(Forward Primer: 5'-AATTCCGTGG TGTTGTCG-3', Reverse Primer: 5'-AAGGTCCGCTG GATTGAG-3')，产物大小为123 bp；设计GV112通用引物(Forward Primer: 5'-CCTATTTCCCATGATTCC TTCATA-3', Reverse Primer: 5'-GT AATACGGTTATC CACGCG-3')，产物大小542 bp；一起交Invitrogen公司合成，规格为2OD。

1.1.5 干扰片段设计与合成 针对大鼠Notch1基因，设计4对N1ICD-shRNA寡核苷酸序列(N1ICD-shRNA-1: GCACAGTGCTGAGTACCAA; N1ICD-shRNA-2: GCCTCTCC ACCAATACCTT; N1ICD-shRNA-3: CCCACATTCCAGAGGCATT; N1ICD-shRNA-4: TCTGGATGCCCGAATGCAT)，分别插入*Age* Ⅰ与*Eco*R Ⅰ酶切位点，交Invitrogen公司合成，规格为2OD。

1.2 方法

1.2.1 pGC-FU-N1ICD-3Flag重组质粒构建及鉴定 以大鼠cDNA文库为模板，PCR法获得N1ICD，经In-Fusion PCR Cloning Kit交换入pGC-FU-EGFP-3Flag Vector，转化DH5α感受态细胞，接种于氨苄青霉素(Amp+，100 μg/ml)的LB培养基平板，次日随机挑选阳性单克隆菌落，菌落PCR鉴定转化子，送基因测序，无突变的克隆命名为pGC-FU-N1ICD-3Flag重组质粒。利用Lipofectamine™ 2000分2组(Control组：转染pGC-FU-EGFP-3Flag Vector、Overexpression组：转染pGC-FU-N1ICD-3Flag重组载体)转染293T细胞，48 h后提总蛋白，Western-blotting检测Flag及β-Actin表达。

1.2.2 GVC112-N1ICD-shRNA干扰质粒构建及筛选 将4对Oligonucleotide退火形成双链，T_4 DNA Ligase连接*Age* Ⅰ与*Eco*R Ⅰ双切酶后的双链Oligonucleotide、GVC112。将4组连接产物转化DH5α化学感受态细胞，接种于Amp+的LB培养基平板，次日随机挑选阳性单克隆菌落，使用GV112通用引物PCR鉴定阳性转化子，行基因测序，序列无误后分别命名为GVC112-N1ICD-shRNA-1、GVC112-N1ICD-shRNA-2、GVC112-N1ICD-shRNA-3、GVC112-N1ICD-shRNA-4。按Lipofectamine™ 2000方法，分5组进行转染293T细胞，其中Control组为pGC-FU-N1ICD- 3Flag+无义干扰质粒、N1ICD-shRNA-1组为pGC-FU-N1ICD-3Flag + GVC112-N1ICD-shRNA-1、N1ICD-shRNA-2组为pGC-FU-N1ICD-3Flag + GVC112-N1ICD-shRNA-2、N1ICD-shRNA-3组为pGC-FU-N1ICD-3Flag + GVC112-N1ICD-shRNA-3、N1ICD-shRNA-4组为pGC-FU-N1ICD-3Flag + GVC112-N1ICD-shRNA-4，48 h后提总蛋白，Western-blotting检测Flag及β-Actin表达。

1.2.3 N1ICD及N1ICD-shRNA慢病毒包装与浓缩 将pGC-FU-N1ICD-3Flag/GVC112-N1ICD-shRNA 20 μg、pHelper 1.0 15 μg、pHelper 2.0 10 μg共转293T细胞，48 h后，收集上清液，浓缩纯化，获得LV-N1ICD及LV-N1ICD-shRNA慢病毒载体，分别采用Real-time PCR及药物筛选法测定LV-N1ICD及LV-N1ICD-shRNA滴度。

1.2.4 H9c2心肌细胞慢病毒感染 H9c2心肌细胞铺板，感染增强液(ENi.S)稀释病毒至20感染复数(MOI)，去除半量DEME+10%FBS，加入稀释病毒，再加入5 μl/ml Ploybrene，混匀，孵育24 h后，更换DMEM+10% FBS，继续培养72 h。

1.2.5 细胞增殖检测 H9c2心肌细胞铺96孔板，每孔加入10 μl CCK-8溶液，CO_2培养箱内继续孵育1.5 h，酶标仪测定450 nm吸光度。

2 结果

2.1 pGC-FU-N1ICD-3Flag重组质粒成功构建

N1ICD经PCR扩增后，1%琼脂糖凝胶电泳可见一条约2364 bp的特异条带(图1A)，与预计结果相符。将

N1ICD插入pGC-FU-EGFP-3Flag Vector获得pGC-FU-N1ICD-3Flag转化子，菌落PCR鉴定，1%琼脂糖凝胶电泳可见一条约665 bp的特异条带(图1B)，与预计结果相符。DNAMAN(Version 6.0.3.99)比对分析基因测序结果，与NlICD基因编码序列完全一致(图1C)。将pGC-FU-N1ICD-3Flag质粒转染293T细胞，48 h后提总蛋白，Western-blotting显示Flag在Overexpression组表达，位置在89 000左右，提示pGC-FU-N1ICD-3Flag重组质粒构建成功，功能正常(图1D)。

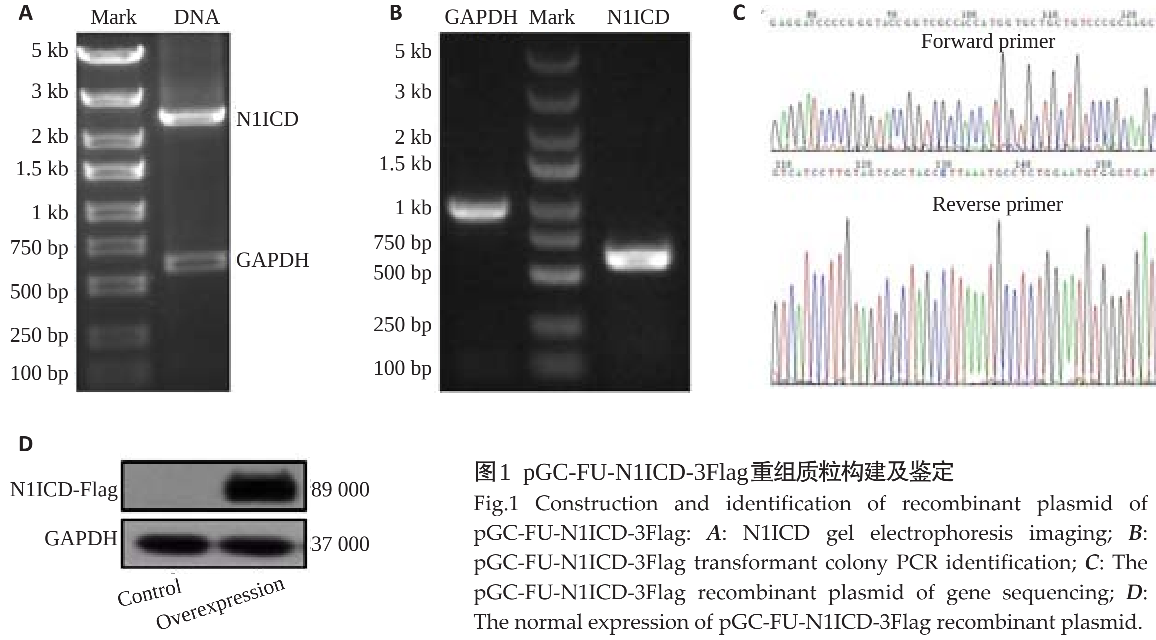


图1 pGC-FU-N1ICD-3Flag重组质粒构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of recombinant plasmid of pGC-FU-N1ICD-3Flag: *A*: N1ICD gel electrophoresis imaging; *B*: pGC-FU-N1ICD-3Flag transformant colony PCR identification; *C*: The pGC-FU-N1ICD-3Flag recombinant plasmid of gene sequencing; *D*: The normal expression of pGC-FU-N1ICD-3Flag recombinant plasmid.

2.2 GVC112-N1ICD-shRNA干扰质粒成功构建及筛选

GVC112-N1ICD-shRNA阳性转化子菌落PCR鉴定，1%琼脂糖凝胶电泳可见一条约586 bp的特异条带，与预计结果相符(图2A)。DNAMAN比对分析基因测序结果，与N1ICD-shRNA基因序列完全一致(图2B~E)。将GVC112-N1ICD-shRNA干扰质粒与pGC-FU-N1ICD-3Flag重组质粒共转293T细胞，48 h后提总蛋白，Western-blotting显示Flag在第4、5组表达最低，约为Mock组的90%，提示GVC112-N1ICD-shRNA-2、GVC112-N1ICD-shRNA-3可有效干扰N1ICD(图2F)。本课题选取GVC112-N1ICD-shRNA-3作为后续实验研究。

2.3 LV-N1ICD、LV-N1ICD-shRNA滴度测定

利用Real-time PCR测定LV-N1ICD滴度，分析不同浓度病毒感染后样品组的Ct值及表达量(表1)，10^{-4} μl组和Con组样品间Ct值存在2个左右差异，认为在10^{-4} μl组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少1个病毒颗粒，则LV-N1ICD滴度为：1/(1.00E-04)×20=2.00E+5TU/μl= 2.00E+8TU/ml。

因LV-N1ICD-shRNA带有Puromycin抗性，所以采用药筛法测定滴度，即通过感染后活细胞数量来判断滴度数值，其值等于带有活细胞数除以病毒原液量。在本实验中，加入1E-5 μl病毒原液的孔中观察到5个细胞存活，说明该孔中至少有5个病毒颗粒感染了细胞，则LV-N1ICD-shRNA滴度为：5/(1E-5)=5E+5TU/μl=5E+8TU/ml。

2.4 Notch1对心肌细胞增殖功能的影响

LV-N1ICD及LV-N1ICD-shRNA分别感染H9c2心肌细胞，利用CCK-8检测细胞活力。结果显示(图3)：LV-N1ICD可明显提高心肌细胞活力(P<0.05)，LV-N1ICD-shRNA可降低心肌细胞活力(P<0.05)，可见Notch1可改善心肌细胞增殖能力。

3 讨论

Notch信号通路无特异性激动剂，因此特异性激活Notch信号通路并非易事。利用Notch激动型抗体，虽然可以激活Notch信号通路，但特异性不佳[6]。Gude等[7]用50 ng/ml的HGF刺激大鼠心肌细胞，在HGF/c-Met/Notch信号转导下间接激活Notch1，在5 min内可使Notch1及Hes1表达增加，效应可维持到6 h，但HGF仍不能直接激活Notch1。Notch信号通路抑制剂包括γ-secretase抑制剂、Notch受体及配体单克隆抑制型抗体，中药成分姜黄素等[8]。作为γ-secretase抑制剂，DAPT可以抑制Notch蛋白向NICD分裂的关键过程，能够非特异性阻断Notch信号通路的所有亚型，同样不适合Notch1信号通路的特异性研究[9]。因此利用基因

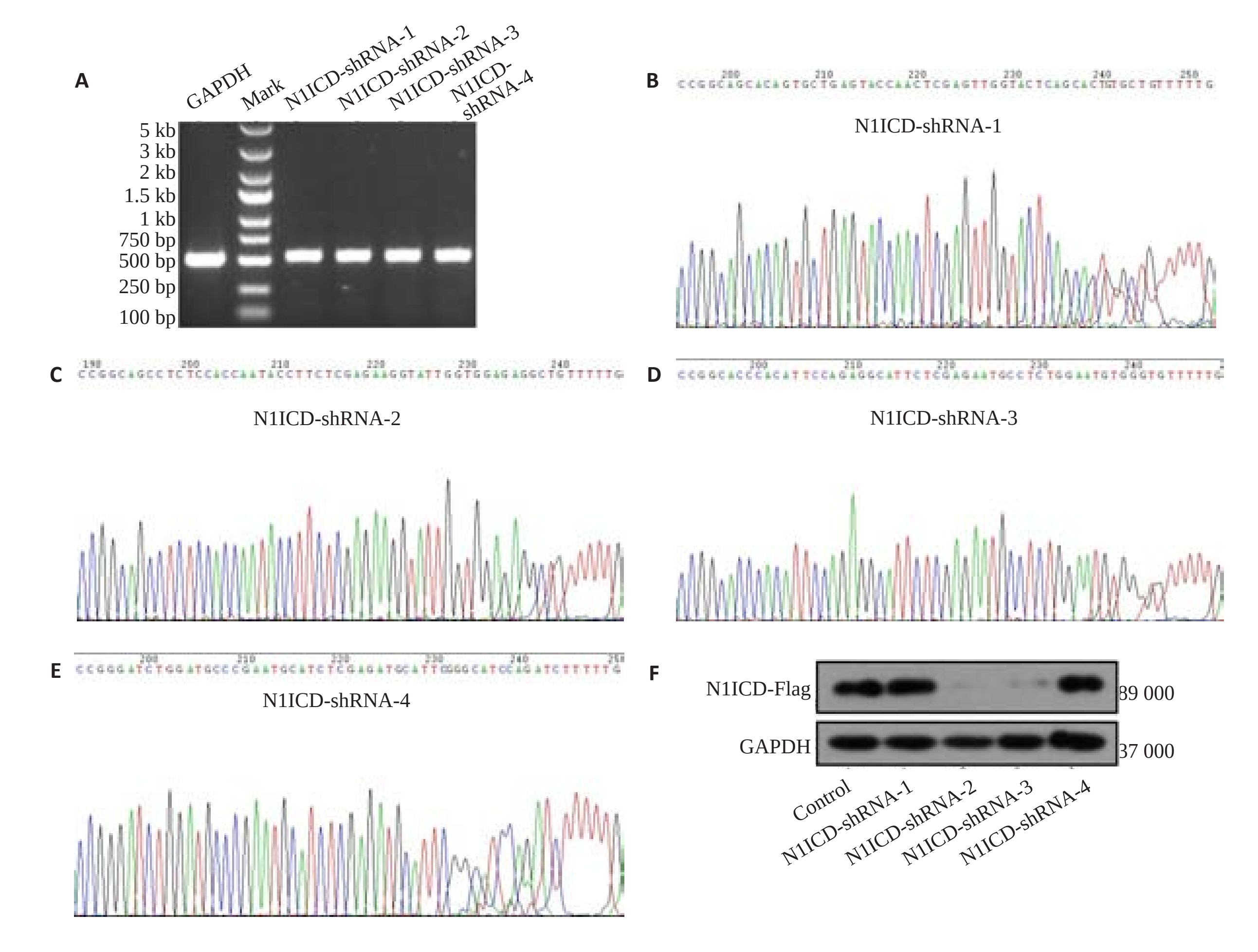


图2 GVC112-N1ICD-shRNA干扰质粒构建

Fig.2 Construction of GVC112-N1ICD-shRNA interference plasmids: ***A***: GVC112-N1ICD-shRNA transformant colony PCR identification; ***B***-***E***: GVC112-N1ICD-shRNA interference plasmid DNA sequencing; ***F***: Screening of GVC112-N1ICD-shRNA interference plasmid.

表1 不同浓度病毒感染后样品组的Ct值及表达量分析

Tab.1 Ct value and expression analysis of different concentrations of virus infection

Sample	Ct_{Actin}	Ct_{N1ICD}	Ct_{N1ICD} Mean	△Ct=Ct_{N1ICD} Mean -Ct_{Actin}	△Ct_{Con}-△Ct_{sample}
Con	14.87	31.92	31.9	17.030	0.000
		31.88			
1 μl	14.26	17.09	17.115	2.855	14.175
		17.14			
10^{-1} μl	14.47	20.49	20.475	6.005	11.025
		20.46			
10^{-2} μl	14.58	23.81	23.78	9.200	7.830
		23.75			
10^{-3} μl	14.6	26.7	26.62	12.020	5.010
		26.54			
10^{-4} μl	14.63	28.98	28.975	14.345	2.685
		28.97			
10^{-5} μl	14.83	31.38	31.345	16.515	0.515
		31.31			

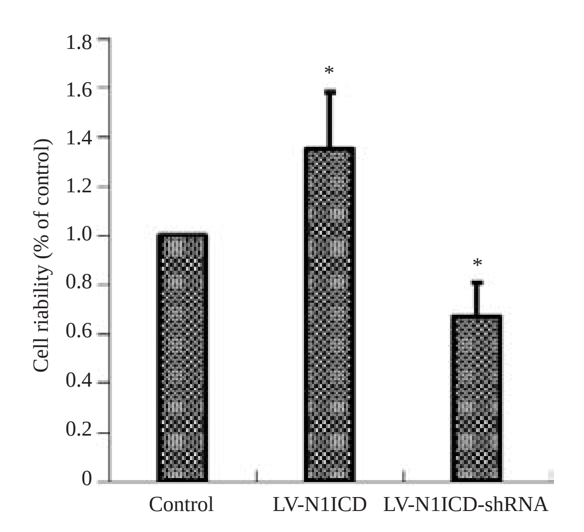


图3 Notch1对心肌细胞活力的影响

Fig.3 Effect of Notch1 on myocardial cell viability. *P*<0.05 *vs* LV-N1ICD; **P*<0.05 *vs* LV-N1ICD-shRNA (*n*=3).

异位表达和RNAi技术,针对特定Notch1蛋白构建相应表达载体,可达到特异性激活或抑制Notch1信号通路的作用。

Notch蛋白由胞外结构域和胞内结构域组成,胞外结构域由36个表皮生长因子样重复序列和3个半胱氨酸富集的LIN12/Notch重复序列组成,表皮生长因子样重复序列负责与Notch配体结合,LIN12/Notch预防Notch信号自身激活[10]。NICD含1个RAM23结构域、6个锚蛋白/cdc10重复序列、2个核定位序列、1个转录激活结构域、1个C末端富集脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的PEST序列。Notch蛋白编码序列长达近7.6kb,全长难以完整克隆。由于Notch信号通路主要通过NICD发挥功能,因此对NICD的功能区进行选择性克隆,是近年Notch信号通路研究的主要手段之一[11]。但NICD在Notch蛋白编码序列上的功能定位各家报道不一,Tezuka K等利用RT-PCR技术获得小鼠cDNA文库,在Notch1 5428-6549位点定向克隆N1ICD,经验证具有Notch1蛋白的生物学功能[12]。由于国内外尚无大鼠N1ICD载体构建报道,因此我们选择Notch第二分裂位点(Gly1743和Val1744[13])作为N1ICD基因克隆位点,经验证该片段具有Notch1蛋白的生物学效应。

目前,用于目的基因转移的的病毒载体主要包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和慢病毒载体[14]。慢病毒载体是逆转录病毒的一个亚型,目前应用较多的来源于HIV-1的病毒载体,载体容量大,可感染非分裂期细胞,能在机体内持续表达。由于N1ICD片段较大,涉及细胞及动物实验,对病毒感染效率要求高,后续有可能需要构建N1ICD稳定表达细胞株,因此我们采用慢病毒载体系统构建N1ICD过表达及干扰载体。研究发现Notch1信号通路可刺激缺血心肌细胞增生,产生良好的心肌保护效应[7]。国内文献报道应用Notch信号通路阻断剂DAPT能抑制原代乳鼠心肌细胞增殖,促使心肌细胞发生凋亡[15],我们分别用LV-N1ICD及LV-N1ICD-shRNA感染H9c2心肌细胞,发现Notch信号可提高心肌细胞活力,可见LV-N1ICD及LV-N1ICD-shRNA构建成功,并具有Notch信号的生物学功能,为将来Notch1信号通路在心肌保护中的功能与机制研究奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(9): 654-66.

[2] Macgrogan D, Luna-Zurita L, de la Pompa JL. Notch signaling in cardiac valve development and disease[J]. Curr Top Dev Biol, 2011, 91(6): 449-59.

[3] Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, et al. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes[J]. J Cell Biol, 2008, 183(1): 117-28.

[4] Campa VM, Gutiérrez-Lanza R, Cerignoli F, et al. Notch activates cell cycle reentry and progression in quiescent cardiomyocytes[J]. J Cell Biol, 2008, 183(1): 129-41.

[5] Li Y, Hiroi Y, Ngoy S, et al. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction[J]. Circulation, 2011, 123(8): 866-76.

[6] Fassbender JM, Myers SA, Whittemore SR. Activating notch signaling post-SCI modulates angiogenesis in penumbral vascular beds but does not improve hindlimb locomotor recovery[J]. Exp Neurol, 2011, 227(2): 302-13.

[7] Gude NA, Emmanuel G, Wu W, et al. Activation of notch-mediated protective signaling in the myocardium[J]. Circ Res, 2008, 102(9): 1025-35.

[8] Bailis W, Yashiro-Ohtani Y, Pear WS. Identifying direct Notch transcriptional targets using the GSI-washout assay[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1187(3): 247-54.

[9] Xie K, Qiao F, Sun Y, et al. Notch signaling activation is critical to the development of neuropathic pain[J]. BMC Anesthesiol, 2015, 15(3): 41.

[10] Wang MM. Notch signaling and Notch signaling modifiers[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(11): 1550-62.

[11] Zhang J, Yin JC, Wesley CS. Notch intracellular domain (NICD) suppresses Long-Term memory formation in adult drosophila flies[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015(2): 145.

[12] Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, et al. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(2): 231-9.

[13] Rand MD, Grimm LM, Artavanis-Tsakonas S, et al. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(5): 1825-35.

[14] Liu YP, Berkhout B. miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1809(11/12): 732-45.

[15] 杨 阳, 段维勋, 周京军, 等. γ-分泌酶抑制剂对正常乳鼠心肌细胞的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2011, 9(2): 89-92.

(编辑:孙昌朋)